

UNIVERSIDADE DE SÃO PAULO
INSTITUTO DE FÍSICA DE SÃO CARLOS

JOÃO GABRIEL GONÇALVES CHIQUITO

Avaliação de efeitos ecotoxicológicos de nanopartículas de óxido de cobre no
cladóceros *Daphnia magna*

São Carlos
2020

JOÃO GABRIEL GONÇALVES CHIQUITO

Avaliação de efeitos ecotoxicológicos de nanopartículas de óxido de cobre no
cladóceros *Daphnia magna*

Trabalho de conclusão de curso apresentado ao
Programa de Graduação em Física do Instituto de
Física de São Carlos da Universidade de São Paulo,
para obtenção do título de Bacharel em Ciências
Físicas e Biomoleculares.

Orientador: Prof. Dr. Valtencir Zucolotto

São Carlos
2020

AUTORIZO A REPRODUÇÃO E DIVULGAÇÃO TOTAL OU PARCIAL DESTE TRABALHO, POR QUALQUER MEIO CONVENCIONAL OU ELETRÔNICO, PARA FINS DE ESTUDO E PESQUISA, DESDE QUE CITADA A FONTE.

Ficha catalográfica elaborada pelo Serviço de Biblioteca e Informação da EESC, com os dados fornecidos pelo(a) autor(a)

Chiquito, João Gabriel Gonçalves

Avaliação de efeitos ecotoxicológicos de nanopartículas de óxido de cobre no cladóceros *Daphnia magna* / João Gabriel Gonçalves Chiquito; orientador Valtencir Zucolotto – São Carlos, 2020.

32 p.

Trabalho de conclusão de curso (Graduação em Ciências Físicas e Biomoleculares) – Instituto de Física de São Carlos, Universidade de São Paulo, 2020.

1. Nanomateriais. 2. Nanotoxicidade. 3. Reprodução. 4. Alimentação. 5. Estresse oxidativo. 6. Sistema antioxidante. 7. Microcrustáceo. I. Título. II. Zucolotto, Valtencir, orient.

AGRADECIMENTOS

Primeiramente, quero agradecer a Deus por ter me proporcionado saúde e perseverança nessa importante fase da minha vida.

À minha família, especialmente minha mãe Maria, meu pai João e minha irmã Gabriela, por todo o suporte e apoio necessário para aprofundar meus estudos e desenvolver minha profissão. Aos meus avós que, apesar de não conseguirem entender meu curso, sempre me incentivaram a perseguir meus sonhos.

À minha primeira orientadora, Adrislaine, por ter me iniciado na vida acadêmica com toda a paciência e zelo possível. Ao professor Zucolotto, que sempre acreditou no meu potencial e me proporcionou todos os recursos necessários para conduzir a minha pesquisa durante esses três anos de iniciação científica.

Dedico este trabalho também a todos os integrantes do GNano, que sempre me ajudaram e transformaram o laboratório em minha segunda casa. Tenho muito carinho por todas as amigas que eu construí neste grupo e as levarei para vida.

A todos meus amigos de Guararapes, com os quais eu compartilho todos os bons e maus momentos e que me amparam continuamente desde a escola.

Minha imensa gratidão a todos os professores e colegas do IFSC, por toda a companhia e suporte que eu obtive durante essa trajetória. Sempre me recordarei com carinho de todas as experiências e pessoas com quem eu me relacionei em São Carlos.

Por fim, meus agradecimentos à Fundação de Amparo à Pesquisa do Estado de São Paulo (FAPESP – nº 2018/14203-4) e ao Conselho Nacional de Desenvolvimento Científico e Tecnológico (CNPq) pelo financiamento (CNPq – nº 101167/2018-0).

RESUMO

Nanopartículas caracterizam-se por apresentarem tamanho inferior a 100 nm e possuem propriedades específicas atraentes, podendo ser utilizadas em diversas áreas como na indústria, na medicina e na agricultura. Uma nanopartícula amplamente empregada são as nanopartículas de óxido de cobre (NPs CuO), possuidoras de excelentes condutividades térmica e elétrica, o que justificam seu uso em processos industriais de transferência de calor e energia. Com isso, a produção de NPs CuO tem aumentado significativamente nos últimos anos, o que também provocou um aumento na sua concentração nos ecossistemas aquáticos devido ao descarte e despejo inadequado desses produtos, ocasionando um possível risco de contaminação aos organismos aquáticos. Como os efeitos e mecanismos de toxicidade das NPs em cladóceros ainda não foram bem elucidados pela literatura, o objetivo desse estudo foi avaliar a toxicidade e respostas bioquímicas de estresse oxidativo das NPs CuO no cladóceros *Daphnia magna*. Os parâmetros avaliados foram imobilidade, reprodução, taxas de alimentação, níveis de geração de espécies reativas de oxigênio (ROS), atividade de enzimas antioxidantes (superóxido dismutase – SOD, catalase – CAT, glutathione peroxidase – GPx) e de desintoxicação (glutathione-S-transferase – GST), além de peroxidação lipídica (LPO). O teste de toxicidade aguda apontou uma concentração efetiva mediana (CE₅₀) de $0,12 \pm 0,03$ mg Cu L⁻¹ e subletais CE₁₀ e CE₂₀ de $0,05 \pm 0,03$ e $0,08 \pm 0,04$ mg Cu L⁻¹, respectivamente. O teste de toxicidade crônica e as taxas de ingestão apontaram efeitos negativos sobre a reprodução e a alimentação do cladóceros na maior concentração testada (0,04 mg Cu L⁻¹). Para os ensaios de produção de ROS com concentrações subletais de NPs CuO, os resultados demonstraram aumento significativo a partir de 0,02 mg Cu L⁻¹, indicando a possibilidade de ocorrência de estresse oxidativo. A análise das enzimas antioxidantes mostrou que houve aumento significativo nas atividades da SOD, CAT, GPx e GST também a partir de 0,02 mg Cu L⁻¹, indicando que o sistema antioxidante do cladóceros foi ativado. Os testes de LPO evidenciaram peroxidação lipídica e danos celulares apenas na maior concentração de 0,04 mg Cu L⁻¹, ressaltando que o sistema antioxidante do cladóceros não foi capaz e suficiente para a total proteção do organismo contra a superprodução de ROS. Este trabalho foi importante para identificar o estresse oxidativo como um dos principais mecanismos de toxicidade das NPs CuO e relacionar seu impacto na sobrevivência, reprodução e alimentação de microcrustáceos filtradores. Nossos dados têm o potencial para alertar as autoridades sobre os efeitos negativos das NPs CuO no ecossistema aquático e ajudar na regulação de normas de despejo desses agentes tóxicos.

Palavras-chave: Nanomateriais. Nanotoxicidade. Reprodução. Alimentação. Estresse oxidativo. Sistema antioxidante. Microcrustáceo.

SUMÁRIO

1.	INTRODUÇÃO.....	9
2.	MATERIAIS E MÉTODOS	13
2.1.	Manutenção do organismo-teste.....	13
2.2.	Síntese e caracterização das nanopartículas de óxido de cobre.....	14
2.3.	Quantificação de cobre e liberação de íons.....	14
2.4.	Determinação da toxicidade aguda, crônica e concentrações subletais.....	15
2.5.	Avaliação das taxas de alimentação.....	15
2.6.	Níveis de geração de espécies reativas de oxigênio.....	16
2.7.	Atividade das enzimas antioxidantes e peroxidação lipídica.....	16
2.8.	Destino dos resíduos.....	17
2.9.	Análise dos dados.....	17
3.	RESULTADOS E DISCUSSÃO.....	19
3.1.	Caracterização das NPs CuO e análise química.....	19
3.2.	Efeitos agudos e crônicos das NPs CuO a <i>D. magna</i>	20
3.3.	Taxas de alimentação.....	23
3.4.	Respostas de estresse oxidativo.....	24
4.	CONCLUSÕES.....	27
	REFERÊNCIAS.....	29

1. INTRODUÇÃO

A produção de nanomateriais e produtos em escala nanométrica tem se tornado uma importante área de investimento mundial, com previsão de alcançar US\$ 11,8 bilhões em 2025 (1). Para os materiais serem considerados pertencentes à escala de nano, a convenção mais aceita e utilizada é a da União Europeia, classificando nanomateriais como partículas livres, agregadas ou aglomeradas, cuja metade dos componentes, pelo menos, estão na escala de 1 a 100 nanômetros (2). As inúmeras possibilidades de exploração das nanopartículas (NPs) se devem as propriedades diferenciadas em relação às suas formas de micro e macropartículas, implicando em maior reatividade e mobilidade (3). Essas propriedades diferenciadas são relacionadas ao tamanho reduzido; elevada área superficial com enormes quantidades de átomos ativos; propriedades de superfície diferenciadas e carga superficial em suas partículas, o que as fazem úteis em diversas áreas: eletrônicos, indústria têxtil, sensores, agricultura, biotecnologia e medicina (4). Assim, o benefício que as nanopartículas e nanomateriais podem trazer para a sociedade atual é extraordinário e inegável.

Apesar das inúmeras possibilidades de uso das NPs, estudos revelam que essas mesmas propriedades diferenciadas também podem se tornar indesejadas para a saúde humana e para o meio ambiente, uma vez que existe a possibilidade de causarem efeitos tóxicos quando despejados irregularmente (5). Estudos mostraram que as NPs apresentam um potencial de risco ambiental bem maior em comparação aos poluentes comuns (6) pois, além de poderem alterar as propriedades físico-químicas do solo e da água (7), também podem provocar bioacumulação nos organismos e biomagnificação na cadeia alimentar, inibição alimentar, diminuição da reprodução e redução populacional dos seres vivos (5,8) e, conseqüentemente, afetar o equilíbrio do ecossistema.

Entre as nanopartículas metálicas, as nanopartículas de óxido de cobre (NPs CuO) vêm despertando atenção nos últimos anos. Elas possuem propriedades catalíticas, condutoras e antibacterianas excepcionais, sendo utilizadas em diversos produtos e processos, como eletrônicos, sensores, catálise química, biocidas agrícolas, tecidos, pinturas e tratamento de água (9-10). Trabalhos recentes têm relatado diversos efeitos tóxicos associados a essas nanopartículas, especialmente em relação à contaminação de organismos de água-doce (11-12), o que pode representar um risco ao ecossistema aquático. Contudo, a maior parte das avaliações ecotoxicológicas das NPs CuO foi realizada em cenários de exposição aguda com concentrações relativamente altas, não sendo encontradas no cenário atual e, portanto, não são classificadas como ecologicamente relevantes.

Nos últimos anos, alguns trabalhos têm reportado alterações bioquímicas em organismos expostos a concentrações ecologicamente relevantes de NPs (13). Assim, a avaliação de biomarcadores bioquímicos, principalmente relacionados ao estresse oxidativo, é uma ferramenta muito utilizada em estudos ecotoxicológicos e vem sendo bastante discutida na área de Nanotoxicologia (14). As espécies reativas de oxigênio (ROS - *Reactive Oxygen Species*) são produtos do metabolismo celular normal em organismos aeróbios e desempenham um papel indispensável nas deficiências antioxidantes e antimicrobianas do organismo, agindo diretamente ou como moléculas sinalizadoras em estresse oxidativo (15). Contudo, altos níveis de ROS, provocados por agentes químicos e NPs, podem se tornar importantes mediadores de danos às estruturas celulares, causando peroxidação lipídica, desnaturação protéica, danos ao DNA e citotoxicidade (16) (Figura 1). Portanto, um equilíbrio adequado de ROS deve ser mantido para a sobrevivência. Desse modo, os organismos desenvolveram defesas antioxidantes que ajudam a lidar com a ameaça. Do sistema antioxidante, o superóxido dismutase (SOD), a catalase (CAT), a glutathione peroxidase (GPx) e a glutathione-S-transferase (GST) são consideradas uma das principais proteções contra o estresse oxidativo.

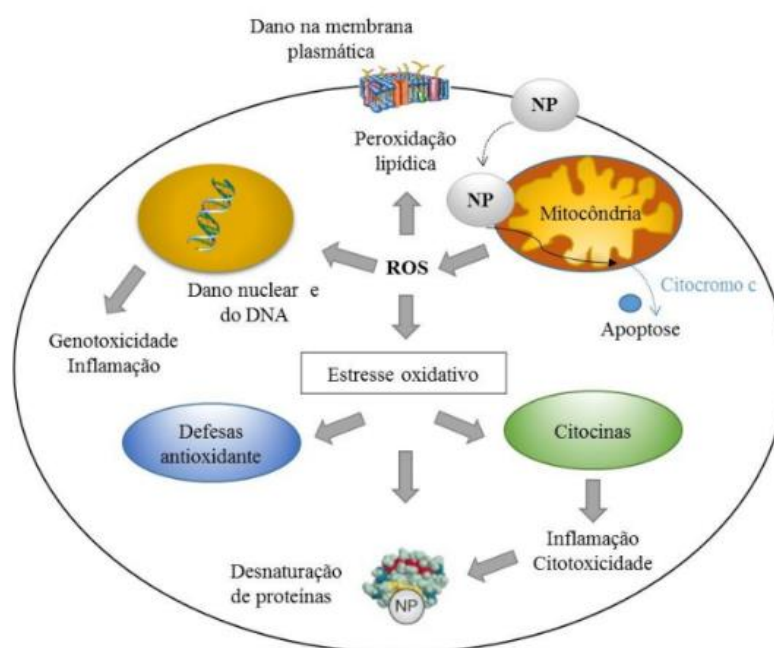


Figura 1 - Possíveis mecanismos mediados pelas espécies reativas de oxigênio (ROS) relacionados à toxicidade de nanopartículas.

Fonte: Adaptada de SANVICENS; MARCO (17).

Para que se possa afirmar que o mecanismo de toxicidade das NPs é o estresse oxidativo, é necessário conhecer o funcionamento do sistema antioxidante e como a geração de ROS influencia nesse processo (18). A Figura 2 esquematiza a ação das principais enzimas da via metabólica. Naturalmente, há a existência de oxigênio molecular (O_2) dentro da célula, seja no citoplasma ou especificamente na mitocôndria. Contudo, a existência de NPs metálicas ou de óxidos metálicos, como NPs CuO, podem auxiliar essa molécula a se reduzir, formando compostos altamente reativos e oxidantes, chamados de espécies reativas de oxigênio (ROS), exemplificado na imagem como o radical $\bullet O_2^-$. A primeira linha de defesa antioxidante contra ROS é a enzima superóxido dismutase (SOD), promovendo a dismutação do $\bullet O_2^-$ em peróxido de hidrogênio (H_2O_2), um composto ainda citotóxico, porém menos oxidativo. Após isso, há duas enzimas que agem na quebra do H_2O_2 , a CAT e a GPx. Ambas reações catalisadas por essas enzimas resultam em compostos não danosos para célula, protegendo o organismo. Se as enzimas antioxidantes forem inibidas ou se não forem suficientes para degradar os radicais ou o peróxido, há o surgimento de novos radicais que, livres na célula, podem provocar danos estruturais, exemplificado no esquema pelos lipídios (peroxidação lipídica). Quando há desequilíbrios no sistema antioxidante e danos oxidativos, caracteriza-se o estresse oxidativo. Por fim, a fim de desintoxicar o citoplasma desses lipídios oxidados, há a ação da enzima GST.

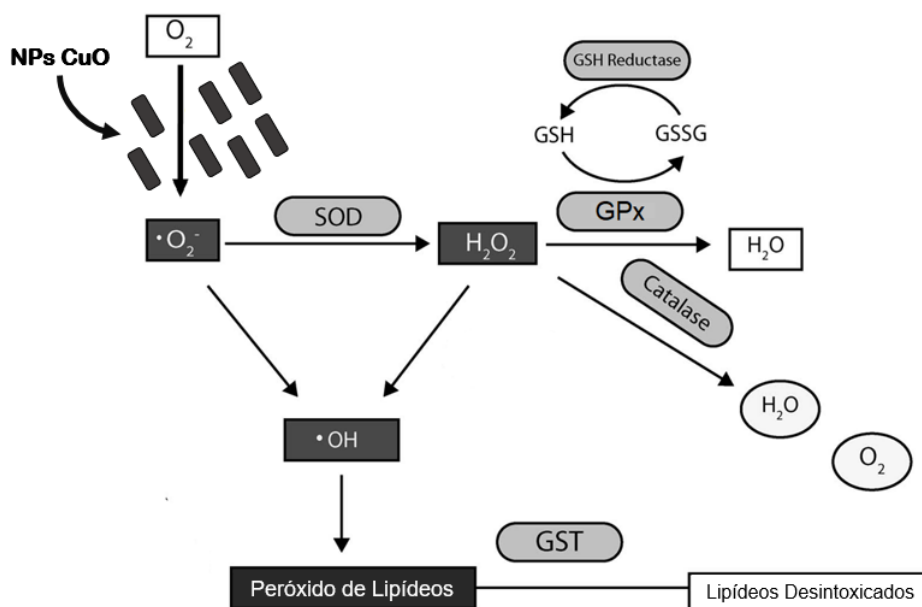


Figura 2 - Via metabólica do sistema antioxidante, com suas principais enzimas de defesa contra as espécies reativas de oxigênio.

Fonte: Adaptada de GUMULEC (19).

Alterações em alguns biomarcadores bioquímicos podem ajudar a explicar os mecanismos subjacentes da toxicidade de NPs (20) e têm potencial para uso como sinais de alerta precoce para efeitos ecologicamente relevantes (21). Para que haja o total entendimento desses mecanismos em animais, é necessário escolher organismos cujos metabolismos, ciclo de vida e sensibilidade são de fácil análise. Por conseguinte, as espécies mais comumente utilizadas em avaliações ecotoxicológicas são os microcrustáceos, mais especificamente o cladóceros *Daphnia magna*. Entretanto, o estudo de alterações bioquímicas na avaliação dos efeitos das NPs em cladóceros ainda requer mais investigações. Em 2014, um estudo propôs que as NPs CuO causam, de fato, a formação de ROS, provocam inibição de enzimas antioxidantes e levam ao estresse oxidativo e danos celulares em *D. magna* (13). Ainda que essa pesquisa tenha elucidado alguns mecanismos de toxicidade, ainda há lacunas a serem preenchidas e enzimas a serem estudadas para que haja o total entendimento dos efeitos bioquímicos das NPs sobre os organismos aquáticos.

O objetivo desta pesquisa foi avaliar a toxicidade e respostas bioquímicas de estresse oxidativo das NPs CuO no cladóceros *Daphnia magna*, sobretudo em concentrações subletais e ecologicamente relevantes. O estudo almejou identificar os efeitos destas nanopartículas na sobrevivência, reprodução, alimentação e desenvolvimento do cladóceros, relacionando com a análise de alterações bioquímicas e identificação de estresse oxidativo. Por fim, este trabalho visou fornecer bases para leis de regulamentação de despejo e de preservação do ecossistema aquático.

2. MATERIAIS E MÉTODOS

2.1. Manutenção do organismo-teste

Os organismos-teste foram cultivados sob recomendações da OECD 202 (22) com temperatura de 20 ± 2 °C, pH de $7,6 \pm 0,3$ e água reconstituída ASTM (23) com dureza de 160 a 180 mg $\text{CaCO}_3 \text{ L}^{-1}$. O meio ASTM foi escolhido devido ao fato de não ter entre os seus componentes o EDTA, evitando qualquer tipo de interferência na possível toxicidade e quelação do composto estudado (cobre). Os organismos foram mantidos em béqueres de vidro com densidade de 25 indivíduos L^{-1} de meio, em incubadora com fotoperíodo de 16:8 h (claro/escuro). A manutenção dos cultivos foi realizada três vezes por semana com renovação parcial das culturas. Os organismos foram alimentados diariamente com suspensão de algas da espécie *Raphidocelis subcapitata* na concentração de 5×10^5 cels mL^{-1} , cultivadas de acordo com a norma da ABNT 12713 (24), complementada por alimento composto, que consiste em ração de peixe fermentada adicionada de fermento biológico.

Apenas os neonatos (idade < 24 h) nascidos da 3ª ninhada foram utilizados nos ensaios, sendo que os organismos da 4ª a 6ª ninhada foram utilizadas para iniciar um novo cultivo. A saúde e sensibilidade das culturas foram garantidas através de testes de toxicidade aguda com a substância de referência dicromato de potássio ($\text{K}_2\text{Cr}_2\text{O}_7$). A Figura 3 ilustra o cultivo e preparação dos cladóceros para as avaliações ecotoxicológicas.

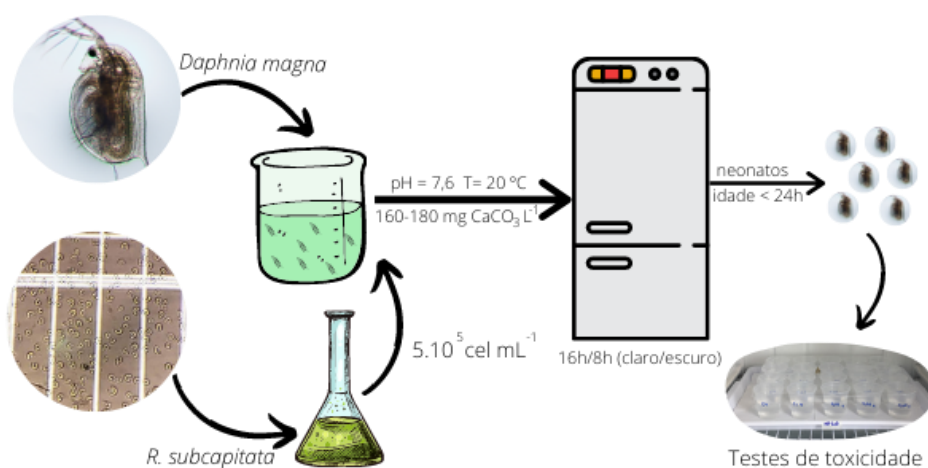


Figura 3 - Cultivos de *D. magna* e preparo para os testes de toxicidade.

Fonte: Elaborada pelo autor.

2.2. Síntese e caracterização das nanopartículas de óxido de cobre

As nanopartículas de óxido de cobre (NP CuO) proposta para este projeto foram sintetizadas de acordo com o método de Misra et al. (25), com algumas modificações. Para isso, 335 μL de ácido acético foram adicionados a 100 mL de uma solução aquosa de 0,02 M $\text{CuSO}_4 \cdot 5\text{H}_2\text{O}$ (Figura 4A) em sistema de aquecimento à 100 °C, com borbulhamento de N_2 e adição de 0,45 g de NaOH, sob agitação (Figura 4B). As amostras foram resfriadas à temperatura ambiente, e em seguida centrifugadas a 700 g por 5 minutos e ressuspensas em água ultrapura. As partículas foram então ressuspensas em uma solução de citrato de sódio 1% m/v e sonificadas por 20 minutos. Por fim, as partículas foram centrifugadas novamente a 10.000 g durante 10 minutos e ressuspensas em água ultrapura (Figura 4C).

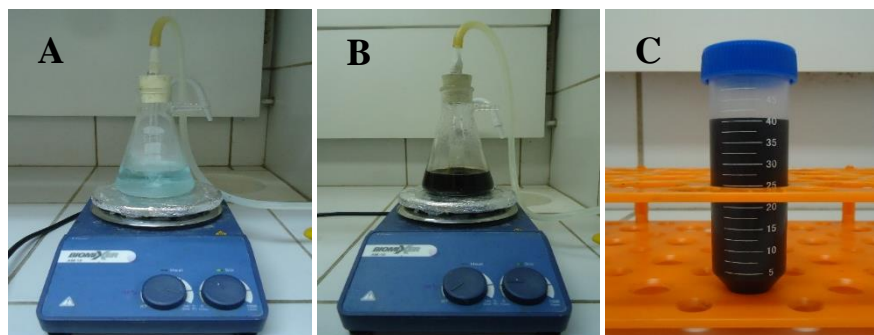


Figura 4 - Síntese das nanopartículas de óxido de cobre: **A)** Solução aquosa de 0,02 M $\text{CuSO}_4 \cdot 5\text{H}_2\text{O}$ com 335 μL de ácido acético glacial; **B)** Solução após adição de 0,45 g de NaOH sob agitação e borbulhamento de N_2 ; **C)** Solução final de NPs CuO ressuspensa em água ultrapura.

Fonte: Elaborada pelo autor.

As NPs preparadas foram submetidas à caracterização do tamanho hidrodinâmico através de espalhamento de luz dinâmico (DLS) e disposição das cargas (potencial zeta) através do equipamento Malvern Spectrometer Nano ZS90 e através de imagens obtidas por microscopia eletrônica de transmissão (MET). Além disso, ainda foi feito a difração de raios X (DRX) para confirmar a formação de CuO e não de outras formas de óxido (Cu_2O , Cu_2O_3 e CuO_2).

2.3. Quantificação de cobre e liberação de íons

As concentrações de cobre nas suspensões de NPs CuO utilizadas (mg Cu L^{-1}) foram quantificadas por espectroscopia de emissão óptica com plasma (ICP-OES, iCAP 7000 Series, Thermo Scientific). Assim, amostras foram coletadas do meio de exposição, acidificadas com 1% HNO_3 e congeladas a -20 °C até análise.

Como a liberação de íons pode afetar negativamente a saúde de animais, é necessário avaliar a capacidade das NPs CuO de liberar íons de cobre. Para isso, testes de dissolução no meio de exposição foram conduzidos na concentração de $0,1 \text{ mg L}^{-1}$ ($n=10$) nas mesmas condições dos testes de toxicidade. Amostras foram coletadas após 0 e 48h e centrifugadas a $7.500g$ por 30 minutos através de um filtro de 3 kDa (Merck Millipore, Alemanha) para remover NPs CuO ou aglomerados. Por fim, as amostras foram acidificadas com 1% HNO_3 e as concentrações de cobre foram analisadas por ICP-OES.

2.4. Determinação da toxicidade aguda, crônica e concentrações subletais

Os testes de toxicidade aguda e crônica foram feitos de acordo com os procedimentos estabelecidos pela OECD (22). Nos testes agudos, foram utilizadas concentrações de 0,0 (controle); 0,025; 0,05; 0,10; 0,20; 0,40 e 0,80 mg Cu L^{-1} . Para cada concentração, existiam quatro réplicas, cada uma contendo cinco neonatos (idade < 24 h) em 10 mL de solução-teste ($n=20$). Os experimentos foram conduzidos em condições semelhantes ao cultivo, porém sem alimentação. Após 48h de exposição, o número de organismos imóveis foi registrado e calculou-se a concentração efetiva mediana (CE_{50}) e as concentrações que causam efeito a 10% (CE_{10}) e 20% (CE_{20}) dos organismos.

Baseado nos resultados dos testes de toxicidade aguda, escolheram-se as concentrações subletais e ecologicamente relevantes de 0,00 (controle); 0,01; 0,02 e 0,04 mg Cu L^{-1} para as exposições crônicas e para todas as exposições subletais. Os testes de toxicidade crônica foram conduzidos com dez réplicas, cada uma contendo um neonato (idade < 24 h) em 50 mL de solução-teste ($n=10$). Os dafnídeos foram alimentados e mantidos nas mesmas condições de cultivo, tendo seus meios de solução-teste renovados a cada 48 h. Durante 21 dias de exposição, foram coletados parâmetros de sobrevivência, reprodução e crescimento das *D. magna*. As variáveis temperatura, pH e oxigênio dissolvido foram mantidos constantes durante os testes de toxicidade, sendo confirmados através de medições no começo e ao fim dos experimentos.

2.5. Avaliação das taxas de alimentação

Os experimentos de alimentação se basearam no método descrito por McWilliam e Baird (26). Neonatos (idade < 24 h) foram expostos a concentrações subletais de NPs CuO e alimentados com a alga *R. subcapitata* na concentração de $5 \times 10^5 \text{ céls mL}^{-1}$. Os ensaios consistiram de quatro réplicas por tratamento, com cinco organismos por réplica ($n=20$). Para cada tratamento, uma

réplica contendo apenas meio e alga foi adicionada para avaliar a variação natural da concentração de alga inicial. Completando-se 24 h de exposição, os dafinídeos foram transferidos para frascos contendo meio limpo com alga (também a 5×10^5 céls mL⁻¹), onde permaneceram por 4 h no escuro (período de pós-exposição). Após o período de exposição e pós-exposição, as concentrações de alga foram determinadas por medidas de fluorescência da clorofila *a*, utilizando o leitor de microplaca SpectraMax M3. Os resultados foram convertidos a células mL⁻¹ através de uma curva de calibração.

2.6. Níveis de geração de espécies reativas de oxigênio

A produção de ROS pela *D. magna* foi determinada utilizando o marcador diacetato de 2',7'-diclorodihidrofluoresceína (H₂DCF-DA). Neonatos (idade < 24 h) foram expostos às concentrações subletais de NPs CuO por 48h. O experimento possuiu quatro réplicas por tratamento, vinte organismos por réplica (n=80). Após exposição, os cladóceros foram coletados e suspensos em tampão fosfato (0,1 M; pH 7,4). Em seguida, eles foram homogeneizados (Ultra-Turrax T10 IKA) e centrifugados por 10 minutos (10.000g; 4 °C). O sobrenadante obtido foi incubado em tampão fosfato com 5 µM H₂DCF-DA por 30 min a 25 °C no escuro. A fluorescência foi medida utilizando o leitor de microplaca SpectraMax M3, com excitação e emissão em 485 e 530 nm, respectivamente. Como controle positivo, foi utilizado 0,5% H₂O₂ (v/v). Os níveis de ROS foram expressos em porcentagem de fluorescência relativa ao controle.

2.7. Atividade das enzimas antioxidantes e peroxidação lipídica

Os ensaios de enzimas antioxidantes e peroxidação lipídica seguiram mesmo procedimento de exposição (48h), homogeneização e centrifugação do item anterior (seção 2.6). Neste experimento, cada concentração subletal possuiu quatro réplicas, com sessenta neonatos por réplica (n=240).

O sobrenadante obtido foi utilizado para determinação da atividade das enzimas superóxido dismutase (SOD), catalase (CAT), glutathione peroxidase (GPx), glutathione-S-transferase (GST) e a peroxidação lipídica (LPO). A atividade de SOD foi determinada de acordo com o método de McCord e Fridovich (27), pela inibição da taxa de redução do citocromo c pelo radical superóxido, em 550 nm a 25°C em espectrofotômetro. A CAT foi determinada de acordo com o método descrito por Clairborne (28), seguindo-se a velocidade de decomposição do H₂O₂ através do decréscimo da absorbância a 240 nm, em espectrofotômetro. A GPx foi determinada segundo Beutler (29), através

da reação da glutathione redutase e da oxidação do NADPH, utilizando o H_2O_2 como substrato. A análise dos níveis de GST foi feita seguindo o método de Habig et al. (30), acompanhando-se a formação do tioéter, monitorado pelo aumento de absorbância a 340 nm. A LPO foi estimada pela produção de espécies reativas ao ácido tiobarbitúrico (TBARS), realizada pela reação de malondialdeído com o ácido 2-tiobarbitúrico, que foi determinado de acordo com Ohkawa e Bird e Draper (31,32). O conteúdo de proteína solúvel total do sobrenadante foi medido pelo método de Bradford (33) utilizando como padrão proteico albumina sérica bovina.

2.8. Destino dos resíduos

Resíduos químicos líquidos das NPs CuO gerados durante a realização das avaliações ecotoxicológicas foram encaminhados ao Laboratório de Resíduos Químicos (LRQ) da USP – São Carlos para posterior separação e tratamento adequado.

2.9. Análise dos dados

Os valores de toxicidade (CE_{10} , CE_{20} e CE_{50}) foram obtidos por meio de curva logística de três parâmetros com o *software* SigmaPlot v. 11.0 (Systat, 2008). As diferenças entre os grupos controles e experimentais foram verificadas por meio da análise de variância (ANOVA one-way). Comparações múltiplas post-hoc (teste de Dunnett) foram realizadas, pois os dados apresentaram distribuição normal e homogeneidade de variâncias (homocedasticidade). Nos testes estatísticos, diferenças foram consideradas significativas quando $p < 0,05$. Gráficos foram confeccionados com o auxílio do *software* Origin (OriginPro 8.5).

3. RESULTADOS E DISCUSSÃO

3.1. Caracterização das NPs CuO e análise química

A imagem por microscopia eletrônica de transmissão (MET) indicou que o formato das NPs CuO é similar a um bastão, comumente chamado de nanobastão (*nanorod*), com tamanho longitudinal e transversal médio de 28 ± 7 nm e 8 ± 2 nm, respectivamente (Figura 5A). Através do DLS, verificou-se o diâmetro hidrodinâmico das NPs em água, que se mostrou ser em torno de 30 nm (91% das partículas esteve entre 21 e 38 nm) (Figura 5B).

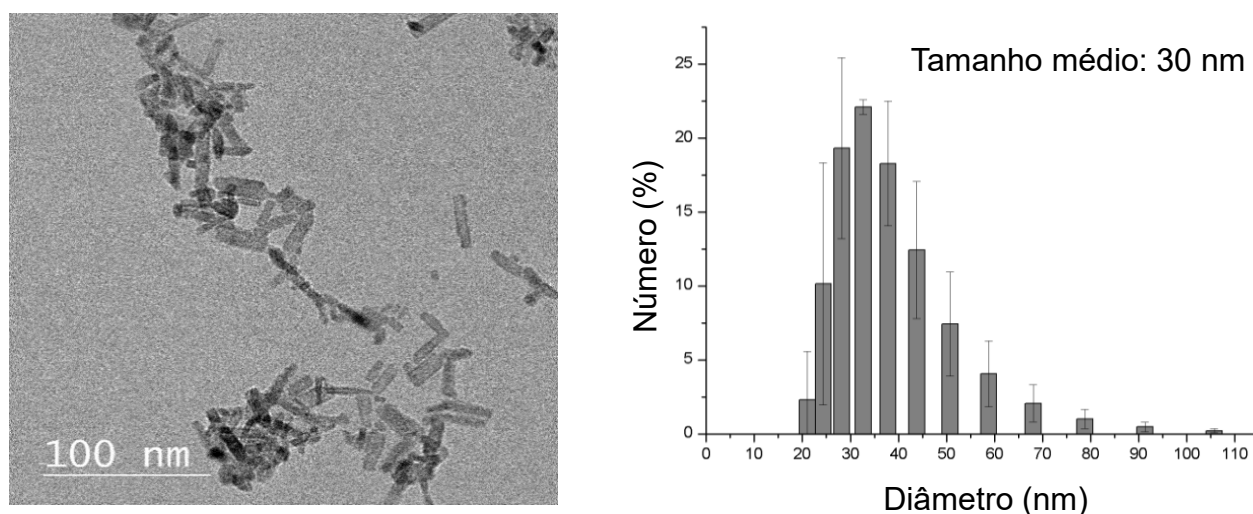


Figura 5 - Imagem das NPs CuO por microscopia eletrônica de transmissão (A) e medidas por DLS (B).
Fonte: Elaborada pelo autor.

A caracterização das NPs CuO pelos padrões de raios X (DRX) antes e depois da funcionalização com citrato de sódio encontram-se na Figura 6. Os picos característicos correspondem à fase monocíclica do CuO por comparação aos arquivos n° 48-1548 do cartão JCPDS (Figura 6).

Após a funcionalização com citrato de sódio, as partículas foram negativamente carregadas apresentando potencial zeta de $-23,5 \pm 0,7$ mV em água ultrapura.

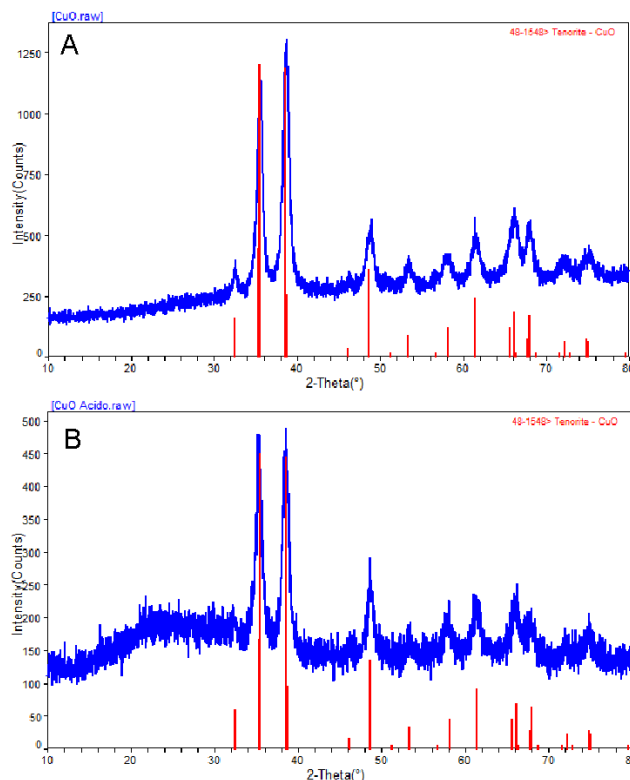


Figura 6 - Padrões de difração de raios-X para NPs CuO antes (A) e após a funcionalização com citrato de sódio (B). As linhas vermelhas verticais correspondem aos padrões do CuO (Tenorite, JCPDS 48-1548).

Fonte: Elaborada pelo autor.

As causas da toxicidade de nanopartículas metálicas podem ser originadas por duas fontes principais: devido às propriedades intrínsecas de nanomateriais e devido à liberação de íons (34). Portanto, é necessário analisar a capacidade das NPs em produzir íons. Os testes de dissolução mostraram que, em meio ASTM, as NPs CuO possuem uma taxa de liberação de íons relativamente baixa. Na exposição inicial (0 h), apenas 1% dos *nanorods* se dissolveram e, após 48h, houve apenas um pequeno incremento de 5,7% na liberação de Cu^{2+} . Misra et al. (25) e outros autores também reportaram uma baixa taxa de liberação ($< 5\%$), o que sugere que a toxicidade das NPs CuO para os organismos é principalmente causada pela sua forma de nanopartícula.

3.2. Efeitos agudos e crônicos das NPs CuO a *D. magna*

Os testes de toxicidade aguda mostraram aumento progressivo da imobilidade em *D. magna* com o aumento da concentração do contaminante, mostrando o padrão dose-dependente (Figura 7). Com o ajuste logístico do gráfico da Figura 7, foi possível determinar os valores da CE_{10} , CE_{20} e CE_{50} : $0,04 \pm 0,03 \text{ mg L}^{-1}$, $0,06 \pm 0,03 \text{ mg L}^{-1}$ e $0,12 \pm 0,03 \text{ mg L}^{-1}$, respectivamente. De acordo com os resultados, as NPs CuO apresentaram alta toxicidade para o cladóceros teste.

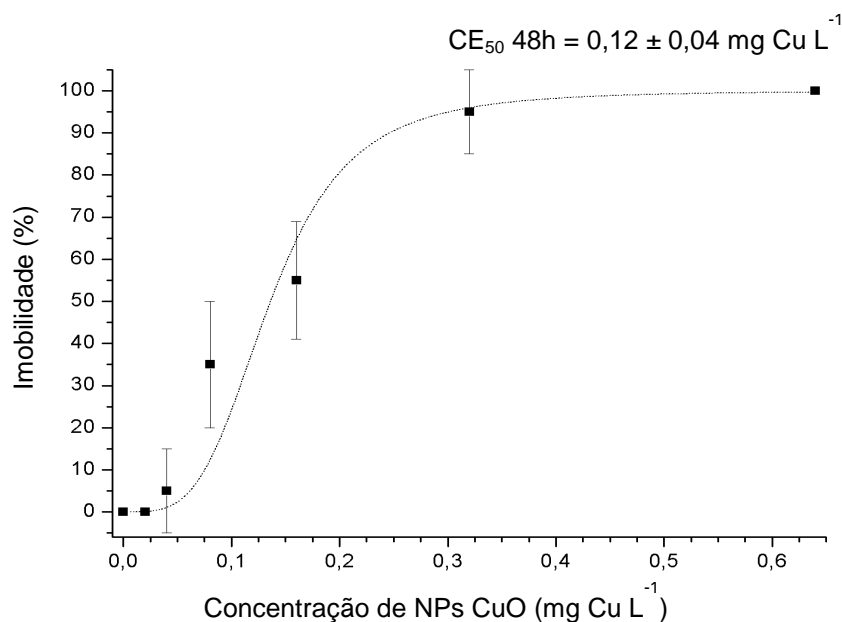


Figura 7 - Imobilidade (%) do cladóceros *D. magna* em diferentes concentrações de NPs CuO. A linha pontilhada representa a curva de ajuste logístico de três parâmetros ($R^2 = 0,98$).

Fonte: Elaborada pelo autor.

Os resultados da literatura para a CE_{50} de NPs CuO em *D. magna* são bastante amplos e apresentam uma diversidade de valores (0,08 a 22,00 mg L⁻¹, (12)). A variação considerável nos resultados de toxicidade é justificada por dois principais fatores: a alteração das condições experimentais e o estado de dispersão ou agregação das NPs metálicas. As condições experimentais, como pH e temperatura, influenciam diretamente a qualidade de vida do organismo, ao passo que, o estado de dispersão das NPs implica diretamente em sua biodisponibilidade. No caso das NPs, fatores como tamanho, formato, composição química também influenciam fortemente em sua disposição e interação com o meio de exposição e em sua toxicidade (25,35).

Na exposição crônica de 21 dias, a sobrevivência do cladóceros não foi afetada nas concentrações testadas (sobrevivência $\geq 90\%$) (Tabela 1). Entretanto, a fertilidade de *D. magna* foi significativamente influenciada pelas NPs CuO, reduzindo o número total de neonatos por fêmea na maior concentração testada (Figura 8). Ademais, também na maior concentração testada, o tempo para a primípara, o número de ninhadas, a quantidade de recém-nascido por ninhada e o crescimento foram gravemente afetados (Tabela 1).

Tabela 1 - Efeitos crônicos das NPs CuO ao cladóceros *D. magna* em diferentes concentrações após 21 dias de exposição ($n = 10$). n.d. = não foi possível determinar. O asterisco (*) indica valor significativamente diferente do controle ($p < 0,05$).

Concentração de NPs CuO (mg Cu L ⁻¹)	Tempo para 1 ^a ninhada (dias)	n° de neonatos por ninhada	n° de ninhadas por fêmea	Tamanho (mm)	Sobrevivência (%)
Controle	8,2 ± 0,2	28,3 ± 1,0	5,0 ± 0,0	5,0 ± 0,0	100
0,01	8,8 ± 0,3	28,2 ± 0,5	5,0 ± 0,1	5,0 ± 0,1	100
0,02	9,1 ± 0,4	26,9 ± 1,3	5,1 ± 0,1	5,1 ± 0,1	90
0,04	n.d.	9,0 ± 4,7*	0,6 ± 0,3*	0,6 ± 0,3*	100

Fonte: Elaborada pelo autor.

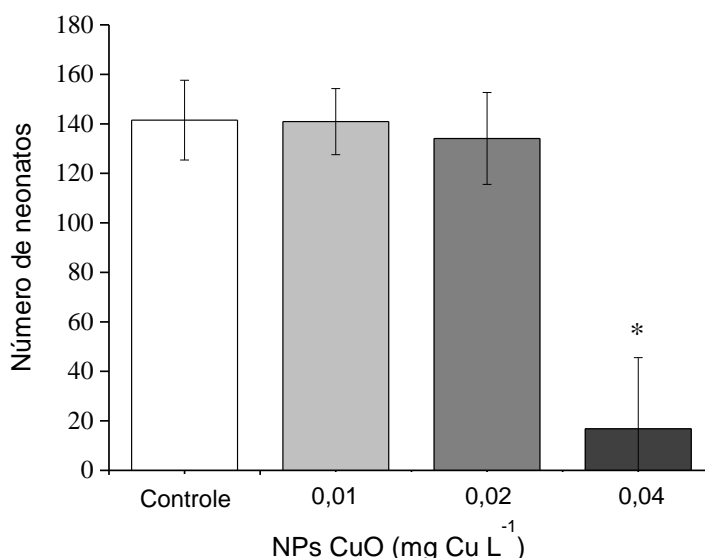


Figura 8 - Fertilidade de *Daphnia magna* (média ± SD do número total de neonatos por fêmea) após 21 dias de exposição a NPs CuO. O asterisco (*) indica valores significativamente diferentes do controle ($p < 0,05$).

Fonte: Elaborada pelo autor.

Em relação ao teste de toxicidade crônica, as análises acima, acerca dos impactos da constituição do meio e da biodisponibilidade do tóxico sobre os resultados, se mantêm fiéis também em menores concentrações. Ainda assim, os resultados são compatíveis com a literatura (36). Os efeitos negativos sobre a reprodução e crescimento de *D. magna* podem estar associados a má-nutrição e estresse oxidativo. As NPs podem ser ingeridas pelos cladóceros e se acumularem no trato gastrointestinal, obstruindo a absorção de nutrientes e levando à deficiência energética para crescimento e reprodução (37,8). Ainda mais, as NPs CuO podem induzir mecanismos de defesa (desintoxicação e sistema antioxidante), o que resulta em custos de energias adicionais e

intensificação da carência energética (38). Consequentemente, devido ao desequilíbrio populacional, exposições subletais e ecologicamente relevantes de NPs CuO podem representar uma ameaça à teia alimentar aquática a longo prazo.

3.3. Taxas de alimentação

Após 24h de exposição, as taxas de alimentação dos dafinídeos diminuíram significativamente na concentração de 0,04 mg L⁻¹ (Figura 9). Para o período de pós-exposição de 4h, os cladóceros afetados pelas NPs CuO não conseguiram se recuperar, mantendo níveis de alimentação inferiores ao grupo controle (Figura 9).

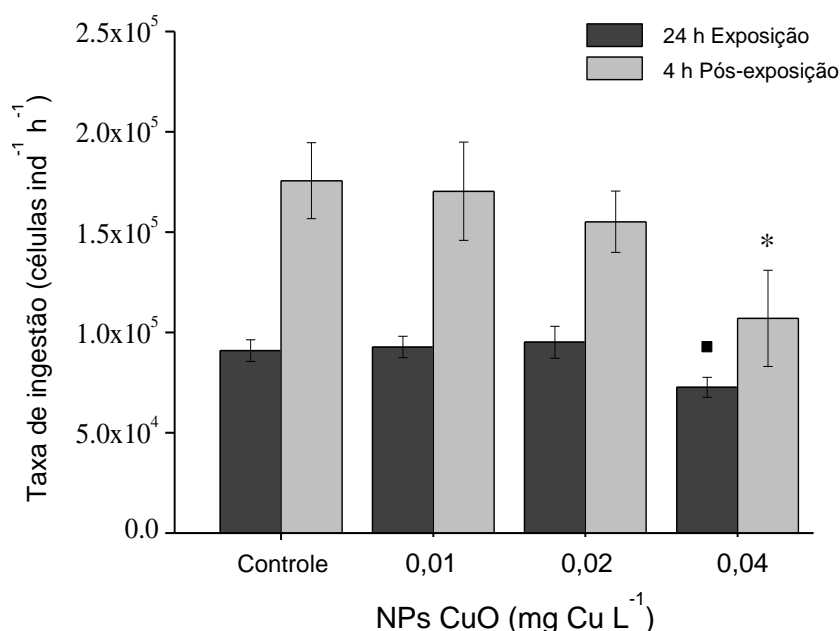


Figura 9 - Taxas de ingestão de microalga para *D. magna* após 24 h de exposição e 4 h de pós-exposição a NPs CuO. * e ■ indicam valores significativamente diferentes do controle ($p < 0,05$).

Fonte: Elaborada pelo autor.

Uma possível justificativa para a inibição alimentar pode ser relacionada a adsorção de NPs nos apêndices filtradores e na acumulação no trato gastrointestinal. Estudos anteriores reportaram que aglomerações de NPs no aparato filtrador, juntamente com grande acumulação e baixa depuração, podem impedir a alimentação dos cladóceros e, consequentemente, seu desenvolvimento e reprodução (39). Por fim, os resultados das taxas de alimentação corroboram com os dados obtidos do teste crônico, indicando que, em 0,04 mg Cu L⁻¹, a má-alimentação pode ter influenciado negativamente na fertilidade dos dafinídeos e no desenvolvimento dos neonatos.

3.4. Respostas de estresse oxidativo

A exposição de *D. magna* a concentrações subletais e ecologicamente relevantes de NPs CuO levaram a alterações nos biomarcadores bioquímicos (Figura 10). Não foi registrada nenhuma mortalidade durante o período de exposição. Os resultados mostraram que as NPs CuO induziram significativamente a produção de ROS em um padrão dose-dependente (Figura 10A). Nas concentrações de 0,02 e 0,04 mg Cu L⁻¹, as NPs CuO causaram um aumento de 48% e 138%, respectivamente, nos níveis de ROS em relação ao controle.

Analisando as enzimas antioxidantes, evidenciou-se um incremento significativo na atividade da SOD, CAT, GPx e GST nas concentrações de 0,02 e 0,04 mg Cu L⁻¹ para *D. magna* (Figura 10B-E), o que corroborou com os resultados obtidos para a geração de ROS. Os dados apontaram aumento nos níveis de LPO (66% em relação ao controle) para cladóceros expostos a 0,04 mg Cu L⁻¹ de NPs CuO (Figura 10F).

Neste estudo, o estresse oxidativo se mostrou um mecanismo de toxicidade relevante associado às NPs CuO. Com o aumento de ROS e a mudança nas atividades das enzimas antioxidantes SOD, CAT, GPx e GST, as NPs mostraram propriedades redox importantes, com grande capacidade para geração de ROS (Figura 10).

Os dados evidenciaram que o aumento da produção de ROS induziu significativamente o aumento das atividades das enzimas antioxidantes, em prol da proteção e supressão do excesso de ROS (Figura 10). De acordo com a Figura 2, todo o sistema antioxidante foi induzido: a SOD promoveu a dismutação do ânion superóxido (O₂•-) em O₂ e H₂O₂, enquanto a CAT e a GPx transformaram o H₂O₂ em substâncias não tóxicas. Mesmo assim, houve peroxidação lipídica (LPO) na maior concentração, indicando que o sistema antioxidante do animal foi incapaz de neutralizar todo o ROS gerado, o que causou prejuízos estruturais aos lipídios. Esses danos oxidativos foram reafirmados ao analisar os níveis de GST: a indução da atividade desta enzima mostrou que houve um aumento no número de lipídios oxidados que foram desintoxicados. Como em 0,04 mg Cu L⁻¹ houve danos celulares causados pelo estresse oxidativo, infere-se que nessa concentração a qualidade de vida do animal pode ter sido fortemente prejudicada. De fato, os dados dos biomarcadores bioquímicos, mais uma vez, corroboram com a taxa de fertilidade de *D. magna*. Na mesma concentração de 0,04 mg Cu L⁻¹, houve uma redução brusca no número de neonatos e nos parâmetros de fertilidade e desenvolvimento (Figura 8, Tabela 1), que podem ser relacionados, neste estudo, aos danos oxidativos, estresse e custos energéticos com o sistema de defesa. Os dados

obtidos são compatíveis com a literatura, que apresenta a capacidade de NPs CuO em causar alterações bioquímicas em *Daphnia magna* (13).

As concentrações utilizadas em todos os testes subletais e crônicos foram classificadas como ecologicamente relevantes por estarem na faixa de concentração prevista para o ambiente aquático (e.g. Chio et al. (40)). Assim, os impactos negativos reportados neste trabalho possivelmente já estão afetando a biota aquática.

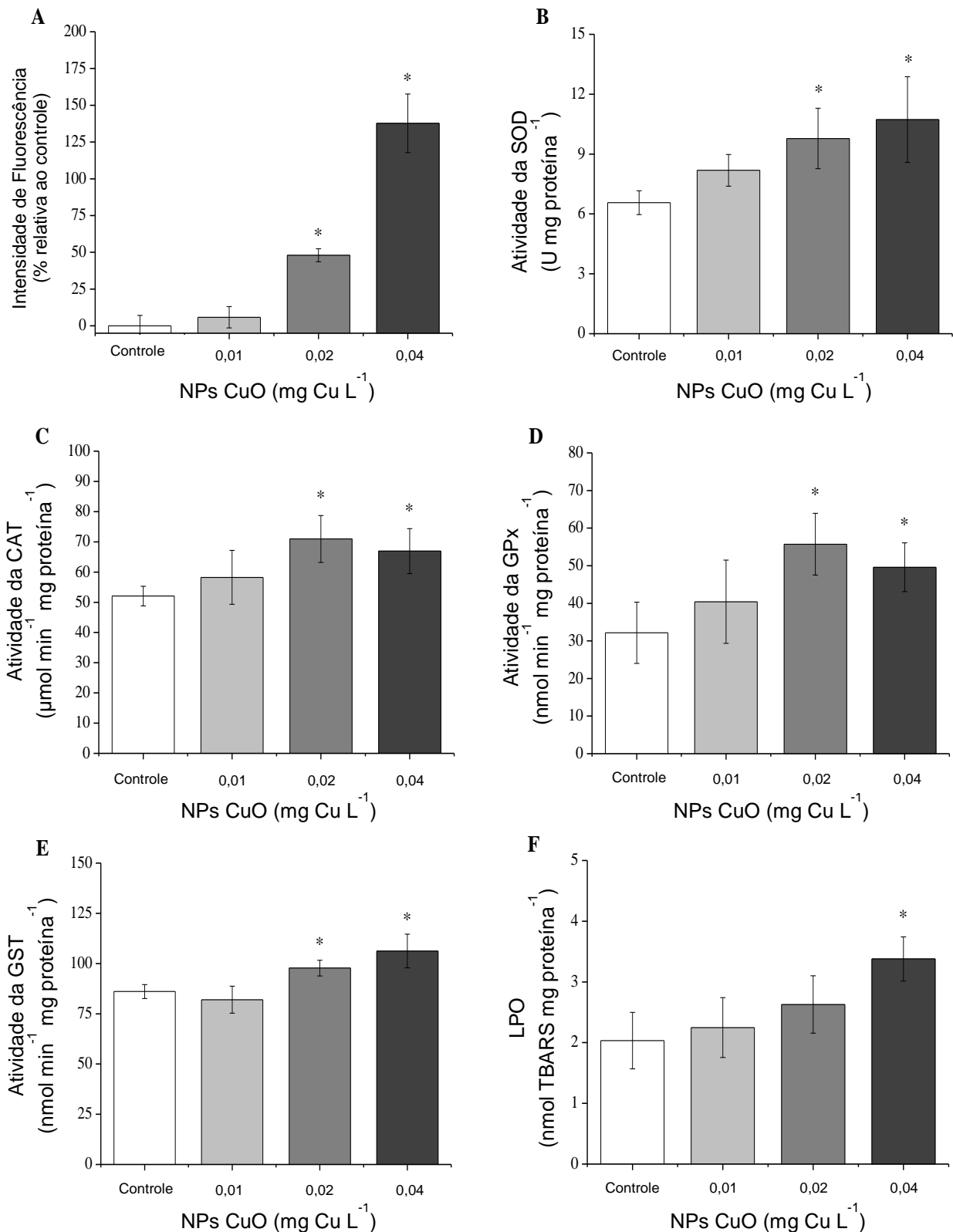


Figura 10 - Respostas dos biomarcadores de estresse oxidativo em *D. magna* após 48h de exposição às NPs CuO. **A)** Espécies reativas de oxigênio (ROS); **B)** Superóxido dismutase (SOD); **C)** Catalase (CAT); **D)** Glutaciona peroxidase (GPx); **E)** Glutaciona-S-transferase (GST); **F)** Peroxidação lipídica (LPO). O asterisco (*) indica valores significativamente diferentes do controle ($p < 0,05$).

Fonte: Elaborada pelo autor.

4. CONCLUSÕES

Neste estudo, as NPs CuO apresentaram impactos negativos na sobrevivência, reprodução, alimentação e no desenvolvimento dos cladóceros *Daphnia magna* em baixas e altas concentrações. Como todas as concentrações utilizadas nos testes crônicos e subletais foram ecologicamente relevantes, nossos resultados revelaram que os efeitos de redução da fertilidade, desequilíbrio populacional e estresse oxidativo em cladóceros podem estar ocorrendo nos ecossistemas aquáticos. Esta pesquisa apontou que, a partir de 0,04 mg Cu L⁻¹ de NPs CuO, os cladóceros não conseguiram superar os efeitos tóxicos das NPs, apresentando danos celulares devido a estresse oxidativo. Portanto, o estresse oxidativo induzido pelas NPs CuO pode ter sido umas das principais causas da redução do crescimento e da reprodução dos cladóceros. É importante ressaltar que os testes foram feitos em condições laboratoriais controladas, portanto, extrapolações da toxicidade de NPs CuO para diferentes espécies e para o meio ambiente requerem atenção e estudos particulares. Nossos dados possuem o potencial para alertar as autoridades sobre o despejo indevido de NPs CuO, além de fornecer bases para ações regulatórias a fim da preservação do ambiente aquático.

REFERÊNCIAS

- 1 LAI, R. W. S.; YEUNG, K. W. Y.; YUNG, M. M. N. *et al.* Regulation of engineered nanomaterials: current challenges, insights and future directions. **Environmental Science and Pollution Research International**, v. 25, n. 4, p. 3060–3077, 2018.
- 2 EUROPEAN COMMISSION. Commission recommendation of 18 October 2011 on the definition of nanomaterial (2011/696/EU). **Official Journal of the European Union**, p. 38-40, 2011. Disponível em: https://ec.europa.eu/research/industrial_technologies/pdf/policy/commission-recommendation-on-the-definition-of-nanomater-18102011. Acesso em: 08.03.2021
- 3 RAUSCHER, H.; ROEBBEN, G.; AMENTA, V.; SANFELIU, A.B.; CALZOLAI, L.; EMONS, H.; GAILLARD, C.; GIBSON, N.; STAMM, H. Towards a review of the EC recommendation for a definition of the term “nanomaterial”. **Report by the Joint Research Centre of the European Commission, European Union**, 2015. DOI 10278836237.
- 4 KHAN, I.; SAEED, K.; KHAN, I. Nanoparticles: properties, applications and toxicities. **Arabian Journal of Chemistry**, v. 12, n. 7, p. 908-931, 2019.
- 5 TIPLE, A. D.; BADWAIK, V. J.; PADWAD, S. V.; CHAUDHARY, R. G.; SINGH, N. B. A review on Nanotoxicology: aquatic environment and biological system. **Materials Today: Proceedings**, v. 29, n. 4, p. 1246-1250, 2020.
- 6 GATOO, M. A.; NASEEM, S.; ARFAT, M. Y. *et al.* Physicochemical properties of nanomaterials: implication in associated toxic manifestations. **BioMed Research International**, v. 2014, p. 498420, 2014.
- 7 BATLEY, G. E.; KIRBY, J. K.; MCLAUGHLIN, M. J. Fate and risks of nanomaterials in aquatic and terrestrial environments. **Accounts of Chemical Research**, v. 46, n. 3, p. 854–862, 2013.
- 8 SOUZA, J. P.; VENTURINI, F. P.; SANTOS, F.; ZUCOLOTTI, V. Chronic toxicity in *Ceriodaphnia dubia* induced by graphene oxide. **Chemosphere**, v. 190, p. 218–224, 2018.
- 9 BONDARENKO, O.; JUGANSON, K.; IVASK, A. *et al.* Toxicity of Ag, CuO and ZnO nanoparticles to selected environmentally relevant test organisms and mammalian cells in vitro: a critical review. **Archives of Toxicology**, v. 87, n. 7, p. 1181–1200, 2013.
- 10 HOU, J.; WANG, X.; HAYAT, T.; WANG, X. Ecotoxicological effects and mechanism of CuO nanoparticles to individual organisms. **Environmental Pollution**, v. 221, p. 209–217, 2017.
- 11 ATES, M.; DUGO, M. A.; DEMIR, V.; ARSLAN, Z.; TCHOUNWOU, P. B. Effect of copper oxide nanoparticles to Sheepshead Minnow (*Cyprinodon variegatus*) at different salinities. **Digest Journal of Nanomaterials and Biostructures**, v. 9, n. 1, p. 369–377, 2014.
- 12 THIT, A.; HUGGINS, K.; SELCK, H.; BAUN, A. Acute toxicity of copper oxide nanoparticles to *Daphnia magna* under different test conditions. **Toxicological & Environmental Chemistry**, v.99, n. 4, p. 665-679, 2017.

- 13 MWAANGA, P.; CARRAWAY, E. R.; VAN DEN HURK, P. The induction of biochemical changes in *Daphnia magna* by CuO and ZnO nanoparticles. **Aquatic Toxicology**, v. 150, p. 201–209, 2014.
- 14 VALE, G.; MEHENNAOUI, K.; CAMBIER, S. *et al.* Manufactured nanoparticles in the aquatic environment-biochemical responses on freshwater organisms: a critical overview. **Aquatic Toxicology**, v. 170, p. 162–174, 2016.
- 15 LETO, T. L.; MORAND, S.; HURT, D.; UEYAMA, T. Targeting and regulation of reactive oxygen species generation by Nox family NADPH oxidases. **Antioxidants & Redox Signaling**, v. 11, n. 10, p. 2607–2619, 2009.
- 16 WANG, L.; GALLAGHER, E. P. Role of Nrf2 antioxidant defense in mitigating cadmium-induced oxidative stress in the olfactory system of zebrafish. **Toxicology and Applied Pharmacology**, v. 266, n. 2, p. 177–186, 2013.
- 17 SANVICENS, N.; MARCO, M. P. Multifunctional nanoparticles--properties and prospects for their use in human medicine. **Trends in Biotechnology**, v. 26, n. 8, p. 425–433, 2008.
- 18 SILVA, A. A. DA; DA SILVA, A. A.; GONÇALVES, R. C. Espécies reativas do oxigênio e as doenças respiratórias em grandes animais. **Ciência Rural**, v. 40, n. 4, p. 994-1002, 2010.
- 19 GUMULEC, J.; RAUDENSKA, M.; HLAVNA, M. *et al.* Determination of oxidative stress and activities of antioxidant enzymes in guinea pigs treated with haloperidol. **Experimental and Therapeutic Medicine**, v. 5, n. 2, p. 479–484, 2013.
- 20 ULM, L.; KRIVOHLAVEK, A.; JURAŠIN, D. *et al.* Response of biochemical biomarkers in the aquatic crustacean *Daphnia magna* exposed to silver nanoparticles. **Environmental Science and Pollution Research International**, v. 22, n. 24, p. 19990–19999, 2015.
- 21 FORBES, V. E.; PALMQVIST, A.; BACH, L. The use and misuse of biomarkers in ecotoxicology. **Environmental Toxicology and Chemistry / SETAC**, v. 25, n. 1, p. 272–280, 2006.
- 22 OECD – ORGANIZATION FOR ECONOMIC COOPERATION AND DEVELOPMENT. Guideline for testing of chemicals. *Daphnia sp.*, acute immobilization test. **OECD 202**, 2004. Disponível em: https://www.oecd-ilibrary.org/environment/test-no-202-daphnia-sp-acute-immobilisation-test_9789264069947-en. Acesso em: 16 mar. 2021.
- 23 ASTM – AMERICAN SOCIETY FOR TESTING AND MATERIALS. Standard Guide for Conducting Acute Toxicity Testing on Test Materials with Fishes, Macroinvertebrates, and Amphibians. **American Society for Testing and Materials, West Conshohocken, PA, E729-E796, USA**, 2001. Disponível em: http://www.poseidonsciences.com/ASTM_E_729.pdf. Acesso em: 16 mar. 2021.
- 24 ABNT – ASSOCIAÇÃO BRASILEIRA DE NORMAS TÉCNICAS. **Ecotoxicologia aquática – toxicidade aguda – método de ensaio com *Daphnia* spp. (Cladocera, Crustacea)**. NBR12713, 2009. Disponível em: <https://www.normas.com.br/visualizar/abnt-nbr-nm/23585/abnt-nbr15088->

ecotoxicologia-aquatica-toxicidade-aguda-metodo-de-ensaio-com-peixes-cyprinidae. Acesso em: 16 mar. 2021.

25 MISRA, S. K.; NUSEIBEH, S.; DYBOWSKA, A. *et al.* Comparative study using spheres, rods and spindle-shaped nanoplatelets on dispersion stability, dissolution and toxicity of CuO nanomaterials. **Nanotoxicology**, v. 8, n. 4, p. 422–432, 2014.

26 MCWILLIAM, R. A.; BAIRD, D. J. Postexposure feeding depression: a new toxicity endpoint for use in laboratory studies with *Daphnia magna*. **Environmental Toxicology and Chemistry / SETAC**, v. 21, n. 6, p. 1198–1205, 2002.

27 MCCORD, J.M.; FRIDOVICH, I. Superoxide dismutase: an enzymic function for erythrocuprein (hemocuprein). **Journal of Biological Chemistry**, v. 244, n. 22, p. 6049-6055, 1969.

28 CLAIRBONE, A. Catalase activity. *In*: GREENWALD, R. A. (ed.) **Handbook of methods in oxygen radical research**. Boca Raton: CRC Press, 1985. p. 283-284.

29 BEUTLER, E. Red cell metabolism: a manual of biochemical methods. **Annual of Internal Medicine**, v. 83, n. 6, p. 919, 1975.

30 HABIG, W. H.; PABST, M. J.; JAKOBY, W. B. Glutathione S-transferases: the first enzymatic step in mercapturic acid formation. **The Journal of Biological Chemistry**, v. 249, n. 22, p. 7130–7139, 1974.

31 OHKAWA, H.; OHISHI, N.; YAGI, K. Assay for lipid peroxides in animal tissues by thiobarbituric acid reaction. **Analytical Biochemistry**, v. 95, n. 2, p. 351–358, 1979.

32 BIRD, R. P.; DRAPER, H. H. Comparative studies on different methods of malonaldehyde determination. **Methods in Enzymology**, v. 105, p. 299-305, 1984. PMID 6727668.

33 BRADFORD, M. M. A rapid and sensitive method for the quantitation of microgram quantities of protein utilizing the principle of protein-dye binding. **Analytical Biochemistry**, v. 72, p. 248–254, 1976.

34 XIAO, Y.; PEIJNENBURG, W. J. G. M.; CHEN, G.; VIJVER, M. G. Impact of water chemistry on the particle-specific toxicity of copper nanoparticles to *Daphnia magna*. **The Science of the Total Environment**, v. 610-611, p. 1329–1335, 2018.

35 ODZAK, N.; KISTLER, D.; BEHRA, R.; SIGG, L. Dissolution of metal and metal oxide nanoparticles in aqueous media. **Environmental Pollution**, v. 191, p. 132–138, 2014.

36 HAI-ZHOU, Z.; GUANG-HUA, L.; JUN, X.; SHAO-GE, J. Toxicity of nanoscale CuO and ZnO to *Daphnia magna*. **Chemical Research in Chinese Universities**, v. 28, n. 3 p. 209-213, 2012.

37 ROSSETTO, A. L. DE O. F.; MELEGARI, S. P.; OURIQUES, L. C.; MATIAS, W. G. Comparative evaluation of acute and chronic toxicities of CuO nanoparticles and bulk using

Daphnia magna and *Vibrio fischeri*. **The Science of the Total Environment**, v. 490, p. 807–814, 2014.

38 SAEBELFELD, M.; MINGUEZ, L.; GRIEBEL, J.; GESSNER, M. O.; WOLINSKA, J. Humic dissolved organic carbon drives oxidative stress and severe fitness impairments in *Daphnia*. **Aquatic Toxicology**, v. 182, p. 31–38, 2017.

39 RIBEIRO, F.; GALLEGU-URREA, J. A.; JURKSCHAT, K.; *et al.* Silver nanoparticles and silver nitrate induce high toxicity to *Pseudokirchneriella subcapitata*, *Daphnia magna* and *Danio rerio*. **The Science of the Total Environment**, v. 466-467, p. 232–241, 2014.

40 CHIO, C.-P.; CHEN, W.-Y.; CHOU, W.-C. *et al.* Assessing the potential risks to zebrafish posed by environmentally relevant copper and silver nanoparticles. **The Science of the Total Environment**, v. 420, p. 111–118, 2012.